

CARTES D'ANALYSE

Patent number: FR2826454
Publication date: 2002-12-27
Inventor: SERVAT VALERIE; CHAPEL JEAN PAUL; THERETZ ALAIN
Applicant: BIO MERIEUX (FR)
Classification:
- **international:** G01N33/545; B01L3/00
- **european:** C08F8/00; G01N33/545
Application number: FR20010008466 20010626
Priority number(s): FR20010008466 20010626

Also published as:

WO03000748 (A1)

Report a data error here**Abstract of FR2826454**

The invention relates to the use of a particular polymer for the production of analysis cards, said polymer having the following properties:- said polymer has a glass transition temperature less than 60 DEG C, - in the absence of any functionalisation said polymer is hydrophobic and, for the purpose envisaged, said polymer is mass functionalised by reactive hydrophilic functions, or reactive hydrophilic function precursors. The application of said polymer permits the simple monitoring of the properties of the surface of said analysis card and, in particular, the support thereof and to modify said properties on the monitored areas. The invention further relates to analysis cards, the support of which is made from said polymer and a method for modifying the surface properties of said support.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 826 454

②① N° d'enregistrement national : 01 08466

⑤① Int Cl⁷ : G 01 N 33/545, B 01 L 3/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 26.06.01.

③① Priorité :

⑦① Demandeur(s) : BIO MERIEUX Société anonyme —
FR et CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE CNRS — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 27.12.02 Bulletin 02/52.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦② Inventeur(s) : SERVAT VALERIE, CHAPEL JEAN
PAUL et THERETZ ALAIN.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BEAU DE LOMENIE.

⑤④ CARTES D'ANALYSE.

⑤⑦ L'invention concerne l'utilisation d'un polymère parti-
culier pour la fabrication de cartes d'analyses, ledit polymè-
re ayant les propriétés suivantes:
- ce polymère possède une température de transition vi-
treuse inférieure à 60°C,
- en l'absence de fonctionnalisation, ce polymère est hy-
drophobe, et

- pour l'application envisagée, il est fonctionnalisé dans
sa masse par des fonctions hydrophiles réactives ou géné-
ratrices de fonctions hydrophiles réactives.

L'utilisation d'un tel polymère permet de contrôler facile-
ment les propriétés de surface de la carte d'analyse et en
particulier de son support, et de modifier ces propriétés sur
des zones contrôlées.

La présente invention a également pour objet les cartes
d'analyses dont le support est fabriqué à partir d'un tel poly-
mère et un procédé pour modifier les propriétés de surface
de ce support.

FR 2 826 454 - A1



La présente invention concerne le domaine technique des matériaux polymères utilisés pour la fabrication de cartes d'analyse.

Les cartes d'analyse permettent l'analyse d'un ou plusieurs échantillons liquides différents, dans lequel on cherche à identifier un ou plusieurs analytes, selon tous les processus simples ou complexes d'analyse mettant en jeu un ou plusieurs réactifs différents selon la nature chimique, physique ou biologique du ou des analytes recherchés. Les cartes d'analyse ne sont pas, en général, limitées à un analyte particulier, la seule condition requise est que l'analyte soit distribué dans l'échantillon à analyser en suspension ou en solution. En particulier, le processus d'analyse mis en oeuvre peut être effectué, sous forme homogène, hétérogène ou mixte.

Une carte d'analyse peut, par exemple, permettre l'analyse biologique, d'un ou plusieurs ligands, nécessitant pour leur détection et/ou leur quantification, l'utilisation d'un ou plusieurs anti-ligands. Aussi, dans ce cas, les cartes d'analyse présentent en surface des ligands biologiques possédant au moins un site de reconnaissance leur permettant de réagir avec une molécule cible d'intérêt biologique.

Un exemple d'application des techniques d'analyse concerne les immunoessais, quelque soit leur format, par analyse directe ou par compétition.

Un autre exemple d'application concerne la détection et/ou la quantification d'acides nucléiques comprenant l'ensemble des opérations nécessaires à cette détection et/ou cette quantification à partir d'un prélèvement quelconque contenant les acides nucléiques cibles. Parmi ces différentes opérations, on peut citer la lyse, la fluidification, la concentration, les étapes d'amplification enzymatique des acides nucléiques, les étapes de détection incorporant une étape d'hybridation utilisant par exemple une puce à ADN ou une sonde marquée. Les demandes de brevet publiées sous les numéros WO 97/02 357 et WO 00/40 590 expliquent différentes étapes nécessaires dans le cas d'analyse d'acides nucléiques.

En terme de réalisation, ces cartes d'analyse peuvent se présenter sous différentes formes, par exemple carrée, rectangulaire ou circulaire. Ces cartes sont constituées d'un support et éventuellement d'un couvercle, le support étant muni d'une pluralité de puits et/ou canaux dans lesquels les différents processus d'analyse sont mis en oeuvre. Les supports des cartes d'analyse et des biopuces sont en général

réalisés par usinage de matériaux choisis parmi le verre, le quartz, le silicium, éventuellement revêtu d'une couche d'oxyde ou de nitrure (WO 93/09 668) ou bien dans des polymères du type polystyrène (FR 2 790 686). Il est également envisagé dans la demande de brevet publiée sous le numéro WO 99/58 245 d'utiliser des matériaux plastiques du type polycarbonate ou polymère hydrocarboné comme les polyoléfines, présentant une surface hydrophobe. Pour contrôler la fluidique des échantillons à analyser, ces matériaux sont modifiés chimiquement ou physiquement, par exemple, sous l'action d'un greffage ou d'un traitement plasma, pour créer des zones hydrophiles et ainsi modifier les caractéristiques de surface du matériau.

10 En effet, pour les applications ci-dessus mentionnées, il est très important de contrôler le caractère hydrophile/hydrophobe des canaux présents sur les supports de ces cartes d'analyse, afin notamment :

- d'éviter la formation de bulles durant le transport de fluides dans ces canaux,
- d'éviter les pertes de liquide dues à des interactions trop fortes entre le fluide et la nature de la surface des canaux,
- 15 - d'éviter l'adsorption sur les parois des molécules biologiques que l'on désire transporter.

Aussi, la présente invention concerne l'utilisation nouvelle d'un matériau polymère particulier pour la fabrication de cartes d'analyse, caractérisée en ce que le polymère :

- 20 - a une température de transition vitreuse inférieure à 60°C, de préférence inférieure à 37°C, et préférentiellement inférieure à 20°C,
- est hydrophobe en l'absence de fonctionnalisation, et
- est fonctionnalisé dans sa masse par des fonctions hydrophiles réactives, ou
- 25 génératrices de fonctions hydrophiles réactives.

L'utilisation des propriétés intrinsèques de ce matériau permettent de modifier simplement les caractéristiques de sa surface, en modifiant localement son caractère hydrophobe/hydrophile.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir des cartes d'analyse qui soient simples, économiques et industrielles.

La présente invention a également pour objet les cartes d'analyse dont le support est fabriqué à partir d'un tel polymère.

Un autre objectif essentiel est de fournir un procédé simple et économique permettant de modifier la surface de certains puits ou canaux du support de ladite carte, en faisant circuler un fluide approprié.

La présente invention a donc pour objet un procédé pour modifier, au moins en
5 partie, la surface du polymère constitutif du support d'une carte d'analyse selon l'invention, ce procédé mettant en oeuvre une étape de traitement de ladite surface, réalisée à une température supérieure à la température de transition vitreuse du polymère, avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec
10 en surface des fonctions hydrophiles réactives présentes dans la masse du polymère et, éventuellement, leur hydrolyse en d'autres fonctions hydrophiles réactives.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir un procédé simple permettant de créer localement des zones hydrophobes ou hydrophiles, dans certains puits ou canaux du support de la carte d'analyse.

15 Selon un autre de ses aspects, l'invention a donc également pour objet un procédé pour modifier localement la surface du polymère constitutif du support d'une carte d'analyse selon l'invention. Ce procédé consiste notamment à réaliser :

- des zones hydrophobes en surface du polymère en effectuant sur les zones à modifier :

20 (1) une étape de traitement de ladite surface, réalisée à une température supérieure à la température de transition vitreuse du polymère, avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, cette étape de traitement entraînant la migration en surface des fonctions hydrophiles réactives présentes dans
25 la masse du polymère et éventuellement, leur hydrolyse en d'autres fonctions hydrophiles réactives, suivie,

(2a) d'une étape de greffage chimique, sur les fonctions hydrophiles réactives présentes en surface, de groupements hydrophobes,

- des zones hydrophiles en surface du polymère en effectuant sur les zones à
30 modifier :

(1) une étape de traitement de ladite surface, réalisée à une température supérieure à la température de transition vitreuse du polymère, avec un

milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, cette étape de traitement entraînant la migration en surface des fonctions hydrophiles réactives présentes dans la masse du polymère et éventuellement, leur hydrolyse en d'autres fonctions hydrophiles réactives, suivie éventuellement,

5 (2b) d'une étape de greffage chimique, sur les fonctions hydrophiles réactives présentes en surface, de ligands biologiques.

Diverses autres caractéristiques ressortent de la description faite ci-dessous, en référence aux dessins annexés.

10 La **fig. 1** représente une vue de dessus d'un support de carte d'analyse muni d'une pluralité de puits à fond ronds.

La **fig. 2A** représente une vue de dessus d'un support de carte d'analyse muni de canaux parallèles et la **fig. 2B** une vue latérale en coupe.

La **fig. 3** représente une vue schématique de dessus d'un embranchement entre
15 canaux.

La **fig. 4** représente les résultats de détection colorimétrique sous forme d'histogrammes, obtenus lors d'un test ELOSA.

L'objet de l'invention concerne l'utilisation d'un polymère particulier pour la fabrication de cartes d'analyses, ledit polymère ayant les propriétés suivantes :

- 20
- ce polymère possède une température de transition vitreuse inférieure à 60°C, de préférence inférieure à 37°C, et préférentiellement inférieure à 20°C,
 - en l'absence de fonctionnalisation, ce polymère est hydrophobe, et
 - pour l'application envisagée, il est fonctionnalisé dans sa masse par des
- 25 fonctions hydrophiles réactives ou génératrices de fonctions hydrophiles réactives.

L'utilisation d'un tel polymère permet de contrôler facilement les propriétés de surface de la carte d'analyse et en particulier de son support, et de modifier ces propriétés sur des zones contrôlées.

30 En effet, les polymères utilisés sont, en l'absence de fonctionnalisation, des polymères hydrophobes. De plus, à une température supérieure à leur température de transition vitreuse, les chaînes des polymères utilisés possèdent une grande mobilité.

Cette propriété est connue et est déjà utilisée, par exemple dans les phénomènes d'adhésion. Aussi, à une température supérieure à leur température de transition vitreuse, si la surface du polymère est mise en contact avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives ou génératrices de fonctions hydrophiles réactives présentes dans le polymère, ces fonctions vont migrer de la masse du polymère à caractère plutôt hydrophobe, vers sa surface. Les groupements hydrophiles, alors présents en surface, viennent du matériau lui-même et non d'un traitement chimique ou physique extérieur. Ainsi, à la différence des surfaces de silicium ou de polymère de type polystyrène utilisées jusqu'à présent, qui nécessitent des traitements assez lourds destinés à promouvoir leur réactivité, notamment des traitements physiques tels que le traitement plasma, le flammage, ou des traitements chimiques tels que le greffage, les polymères utilisés dans la présente invention possèdent des propriétés intrinsèques qui permettent de modifier simplement leur surface.

Pour la présente invention, la technique de référence de la mesure de la transition vitreuse (T_g) est décrite dans « Technique de l'Ingénieur », volume AM2, numéro AM 3274.

Comme exemple de fonctions hydrophiles selon l'invention, on peut citer les groupements hydrazino, imino, azido, thiophosphate, hydrazono, sulfamoyle, thiocarboxy, amide éventuellement substitué, triazano, triazéno, amido, semicarbazono, carbamoyle, cyano, alkylthio, arylthio, sulfate, sulfonate, phosphate, anhydride, époxyde, acide carboxylique, hydroxyle ou amine ...

Les fonctions du type anhydride, époxyde, acide carboxylique ($-\text{COOH}$), hydroxyle ($-\text{OH}$) ou amine primaire ($-\text{NH}_2$) sont des fonctions hydrophiles réactives préférées. Ces fonctions ont l'avantage de permettre ultérieurement le greffage de molécules hydrophobes ou de ligands biologiques.

L'utilisation des polymères fonctionnalisés en masse permet d'une part, d'avoir un potentiel de fonctions disponibles plus important que dans le cas d'une simple fonctionnalisation de surface et d'autre part, d'utiliser une plus grande diversité de fonctions hydrophiles par rapport aux traitements physiques, tel que le traitement plasma.

La présente invention a également pour objet les cartes d'analyse dont le support est fabriqué à partir d'un tel polymère.

D'une manière générale, le circuit fluide des cartes d'analyse selon l'invention comprend des éléments tels que des canaux ou microcanaux, des vannes
5 ou des intersections de canaux (en forme de T, en forme de Y ou en forme de croix), des parties de circuit qui autorisent l'incubation (des puits ou des canaux serpentant) ou la séparation (des longueurs de canaux équivalents à des colonnes par exemple).

La fig. 1 est une vue de dessus d'un exemple simple d'un support 1 de carte d'analyse muni d'une pluralité de puits 2 à fond rond. Ce support de dimension
10 $65 \times 35 \times 4 \text{ mm}^3$ possède des puits en forme de demi sphère de 5 mm de diamètre sur une profondeur de 2,5 mm.

Les fig. 2A et 2B représentent une autre variante simple d'un support 1 de carte d'analyse muni de canaux parallèles 3. Ce support de dimension $65 \times 35 \times 4 \text{ mm}^3$
15 possède des canaux en forme de demi cylindre de 2 mm de diamètre sur une profondeur de 1 mm.

En fonction du type d'analyse effectuée sur la carte, la forme des cartes d'analyse peut varier. Les cartes d'analyse selon l'invention peuvent utiliser un principe de séparation par électrophorèse capillaire.

Selon une autre variante de réalisation des cartes, les fluides sont acheminés,
20 non plus électriquement mais par un système de pompe extérieur ou intégré, de vide, de pousse-seringue, ou par la force centrifuge comme dans le système décrit, par exemple, dans la demande de brevet publiée sous le numéro WO 99/58 245.

Un autre exemple de carte d'analyse est celui présenté dans les brevets US 5,766,553 et US 4,318,994. Ces cartes consistent en une soixantaine de puits,
25 tous reliés à une entrée commune par un ensemble de microcanaux. Ces puits sont tous remplis simultanément par une mise sous vide suivie d'un retour à pression atmosphérique.

Les cartes d'analyses peuvent être obtenues par moulage de précision de ces dits polymères mais toute autre méthode de fabrication et notamment celles utilisées
30 dans les techniques des semi-conducteurs, comme celles décrites dans les demandes de brevet publiées sous les numéros WO 97/02 357 et WO 00/78 452, sont utilisables pour la fabrication de ces cartes d'analyse.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les polymères utilisés pour fabriquer les cartes d'analyse présentent une température de transition vitreuse inférieure à 20°C. Ainsi, le polymère est caoutchoutique et ses chaînes sont mobiles, à température ambiante.

- 5 Par polymère hydrophobe en l'absence de fonctionnalisation, on entend par exemple des polymères dont l'angle de contact avec l'eau est supérieur ou égal à 90°. Ces angles de contact sont, par exemple, déterminés en déposant, à l'aide d'une microseringue, une goutte d'eau sur la surface plane du polymère à étudier, puis l'angle de contact est mesuré à partir des dimensions de la goutte, selon une méthode
10 bien connue de l'homme de l'art.

Les polyoléfines fonctionnalisées, et en particulier le polyéthylène ou le polypropylène fonctionnalisés sont des exemples de polymères utilisés selon la présente invention.

- En particulier, le polyéthylène ou le polypropylène fonctionnalisés par de l'acide
15 acrylique, ou de préférence de l'anhydride maléique est utilisé. Avantageusement le polymère utilisé contient jusqu'à 2%, de préférence jusqu'à 0,3% en poids d'anhydride maléique.

- D'autres polymères tels que le polyéthylène imine (PEI), le polyéthylènevinylacétate (PEVA), des terpolymères d'éthylène, d'esters acryliques et
20 de méthacrylate de glycidyle ou d'anhydride maléique, commercialisés respectivement par la société ATOFINA sous les noms LOTADER® et OREVAC® peuvent également être mis en oeuvre.

- La présente invention a également pour objet un procédé pour modifier, au moins en partie, la surface du polymère constitutif du support d'une carte d'analyse
25 selon l'invention. Ledit procédé comprend une étape de traitement de ladite surface, réalisée à une température supérieure à la température de transition vitreuse du polymère, avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, cette étape de traitement entraînant la migration en surface des fonctions hydrophiles réactives présentes dans la masse du polymère
30 et éventuellement, leur hydrolyse en d'autres fonctions hydrophiles réactives.

Comme milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, on pourra citer, à titre non limitatif, le glycérol ou

l'éthylène glycol, ou de préférence des milieux polaires ou hydrophiles, comme par exemple, l'eau ou un liquide contenant au moins 50 % en poids d'eau, tel qu'un mélange eau/solvant organique comme le diméthylsulfoxyde.

Selon la présente invention, il est donc très simple de modifier le caractère hydrophobe/hydrophile de la surface du support des cartes d'analyse, le traitement étant effectué en faisant circuler ou en mettant en contact la surface avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, pendant 1 à plusieurs heures, par exemple 15 heures. En effet, le simple contact de la surface du polymère avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, et en particulier avec un milieu polaire ou hydrophile, entraîne la migration des chaînes hydrophiles présentes dans la masse du polymère, en surface de celui-ci. Dans le cas particulier des polyoléfines greffées à l'anhydride maléique, lorsque un liquide polaire tel que l'eau est utilisé, cette migration s'accompagne d'une hydrolyse de certaines fonctions anhydride en fonctions -COOH.

Ce traitement peut être suivi par une étape de greffage chimique sur les fonctions hydrophiles réactives présentes en surface, de ligands biologiques. Cette étape de greffage peut être précédée d'une étape d'activation des fonctions hydrophiles réactives présentes en surface.

Par ligand biologique, on entend un composé qui possède au moins un site de reconnaissance lui permettant de réagir avec une molécule cible d'intérêt biologique. A titre d'exemple on peut citer, comme ligands biologiques, les polynucléotides, les antigènes, les anticorps, les polypeptides, les protéines et les haptènes.

Le terme "polynucléotide" signifie un enchaînement d'au moins 2 désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au moins un nucléotide modifié, par exemple au moins un nucléotide comportant une base modifiée tel que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation. Ce polynucléotide peut aussi être modifié au niveau de la liaison internucléotidique comme par exemple les phosphorothioates, les *H*-phosphonates, les alkyl-phosphonates, au niveau du squelette comme par exemple les alpha-oligonucléotides (FR 2 607 507), ou les PNA

(Egholm M. *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1895-1897), ou les 2-O-alkyl ribose, ou les LNA (de l'anglais « Locked Nucleic Acids », décrits notamment dans la demande de brevet publiée sous le numéro WO 00/66 604). Chacune de ces modifications peut être prise en combinaison. Le polynucléotide peut être un
5 oligonucléotide, un acide nucléique naturel ou son fragment comme un ADN, un ARN ribosomique, un ARN messenger, un ARN de transfert, un acide nucléique obtenu par une technique d'amplification enzymatique.

Par "polypeptide", on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés. Par acides aminés, on entend les acides aminés primaires qui codent pour les
10 protéines, les acides aminés dérivés après action enzymatique comme la *trans*-4-hydroxyproline et les acides aminés naturels mais non présents dans les protéines comme la norvaline, la *N*-méthyl-L-leucine, la sélénine (Hunt S. dans Chemistry and Biochemistry of the amino acids, Barrett G.C., ed., Chapman and Hall, London, 1985), les acides aminés protégés par des fonctions chimiques utilisables en synthèse
15 sur support solide ou en phase liquide et les acides aminés non naturels.

Le terme "haptène" désigne des composés non immunogènes, c'est-à-dire incapables par eux-mêmes de promouvoir une réaction immunitaire par production d'anticorps, mais capables d'être reconnus par des anticorps obtenus par immunisation d'animaux dans des conditions connues, en particulier par
20 immunisation avec un conjugué haptène-protéine. Ces composés ont généralement une masse moléculaire inférieure à 3000 Da, et le plus souvent inférieure à 2000 Da et peuvent être par exemple des peptides glycosylés, des métabolites, des vitamines, des hormones, des prostaglandines, des toxines ou divers médicaments, les nucléosides et les nucléotides.

25 Le terme "anticorps" inclut les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, les anticorps obtenus par recombinaison génétique et des fragments d'anticorps. Le terme "antigène" désigne un composé susceptible d'être reconnu par un anticorps dont il a induit la synthèse par une réponse immune. Le terme "protéine" inclut les holoprotéines et les hétéroprotéines comme les nucléoprotéines, les lipoprotéines, les
30 phosphoprotéines, les métaloprotéines et les glycoprotéines aussi bien fibreuses que globulaires.

L'étape de traitement avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, conférant un caractère hydrophile à la surface, peut également être suivie par une étape de greffage chimique sur les fonctions hydrophiles présentes en surface, de groupements hydrophobes. Un tel greffage confère alors des propriétés hydrophobes à la surface, proches de ses propriétés initiales. Les groupes de type silane comme les thiolsilanes, tel que le mercaptopropyltriméthoxysilane, les alkylsilanes, tels que le diméthyléthoxysilane (DMES) et le *n*-octadécyltriéthoxysilane, sont des exemples de groupements hydrophobes utilisables.

10 Les étapes de greffage chimique de groupements hydrophobes ou hydrophiles sont effectuées selon des techniques bien connues de l'homme de l'art.

La présente invention a également pour objet un procédé pour modifier localement la surface du polymère constitutif du support d'une carte d'analyse selon l'invention. Ce procédé consiste à réaliser :

15 – des zones hydrophobes en surface du polymère en effectuant sur les zones à modifier :

(1) une étape de traitement de ladite surface, réalisée à une température supérieure à la température de transition vitreuse du polymère, avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, ce traitement entraînant la migration en surface des fonctions hydrophiles réactives présentes dans la masse du polymère et éventuellement, leur hydrolyse en d'autres fonctions hydrophiles réactives, suivie,

20

(2a) d'une étape de greffage chimique, sur les fonctions hydrophiles présentes en surface, de groupements hydrophobes,

25

– des zones hydrophiles sont réalisées en surface du polymère en effectuant sur les zones à modifier :

(1) une étape de traitement de ladite surface, réalisée à une température supérieure à la température de transition vitreuse du polymère, avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, ce traitement entraînant la migration en surface des fonctions hydrophiles réactives présentes dans la masse du

30

polymère et éventuellement, leur hydrolyse en d'autres fonctions hydrophiles réactives, suivie éventuellement,

- 5 (2b) d'une étape de greffage chimique, sur les fonctions hydrophiles présentes en surface, de ligands biologiques, par exemple, choisis parmi les polynucléotides, les antigènes, les anticorps, les polypeptides, les protéines et les haptènes.

Pour modifier localement la surface du polymère, l'utilisation de masques ou la circulation de fluides, pourra, par exemple, être mise en oeuvre.

- 10 L'utilisation de masques permet de ne mettre que les surfaces non masquées en contact avec des solutions et donc de ne modifier que celles-ci.

- Par contre, lorsque la circulation d'eau ou d'autres solutions est utilisée, il faut que la structure de la carte se prête à une modification limitée aux zones désirées. En jouant sur la forme des embranchements ou intersections entre canaux, il est possible de créer des vannes. La **fig.3** représente une intersection 4 aménagée sur un support de carte d'analyse selon l'invention et comportant un premier canal 5 et un deuxième canal 7 se rejoignant pour former un canal commun 6. La circulation d'un fluide hydrophile, par exemple l'eau, dans les canaux 5 et 6 dans le sens **f1** permet de faire migrer en surface les chaînes hydrophiles présentes dans le polymère, rendant ainsi la surface des canaux 5 et 6 hydrophile. Aussi, si une solution aqueuse est acheminée dans le canal 6, dans le sens inverse **f2**, elle choisira préférentiellement au niveau de l'embranchement 4, le canal 5, plutôt que le canal 7 qui est resté hydrophobe.

La présente invention a donc également pour objet les cartes d'analyse selon l'invention dont le support a une surface modifiée, au moins en partie, grâce au procédé ci-dessus.

- 25 Il est très important de contrôler localement le caractère hydrophobe/hydrophile des cartes d'analyse. Par exemple, dans le cas des cartes d'analyse destinées à des échantillons contenant des protéines, il est connu que certaines protéines s'adsorbent préférentiellement sur des surfaces hydrophobes. Aussi, pour éviter de perdre des protéines sur la surface des canaux ou des puits, il est important de modifier leur paroi, de manière à les rendre hydrophiles, éventuellement non chargées.
- 30

De même, pour des cibles nucléiques, une surface hydrophile chargée négativement empêche préférentiellement ces molécules de s'adsorber par répulsion électrostatique. Au contraire, il peut également être envisagé d'adsorber des protéines sur des parois ou des zones déterminées. Il est alors nécessaire de rendre ces zones hydrophobes. Cependant, l'adsorption de protéines sur des parois hydrophobes change la nature de ces dernières.

Pour mettre en évidence l'adsorption de ligands biologiques sur la surface des cartes d'analyses et en particulier de cibles ADN, on peut par exemple injecter une solution initiale de cibles en concentration connue et récupérer la solution en sortie du circuit fluidique. Ces deux solutions sont ensuite soumises à une réaction d'amplification de type PCR et déposées sur gel d'électrophorèse. La quantification est alors effectuée en comparant l'intensité des bandes d'électrophorèse obtenues. Des marqueurs fluorescents s'intercalant dans l'ADN double brin peuvent également être utilisés.

A titre d'exemples non limitatifs selon l'invention, des support de cartes d'analyse selon la fig.1 ou la fig.2 sont réalisés par moulage à 200°C, soit de granulés de polyéthylène fonctionnalisé avec 0,26 % en poids d'anhydride maléique (référence : PEgAM XA 255 de la société SOLVAY), soit de granulés de polypropylène fonctionnalisé avec 0,05 % en poids d'anhydride maléique (référence : PRIEX GP 12 de la société SOLVAY), soit de granulés de polypropylène fonctionnalisé avec 0,08 % en poids d'anhydride maléique (référence : PRIEX GP 13 de la société SOLVAY). Le polyéthylène utilisé a une température de transition vitreuse de l'ordre de -120 °C et les polypropylènes utilisés ont une température de transition vitreuse proche de l'ordre de -20°C. Ces polymères sont donc caoutchoutiques à température ambiante.

L'écoulement et la formation de bulles après plusieurs passages sur les supports de carte d'analyse selon l'invention sont étudiés visuellement, par exemple, par l'intermédiaire d'une caméra et d'un microscope.

Pour des raisons pratiques, les mesures d'angle de contact avec l'eau, mettant en évidence les différentes propriétés hydrophile/hydrophobe de surface obtenues grâce au procédé selon l'invention, sont réalisées sur des supports plans et non sur ces supports munis de puits ou de canaux.

Les exemples ci-après illustrent donc le procédé de modification de surface selon l'invention et mettent en évidence les propriétés hydrophile/hydrophobe de surface obtenues.

5

EXEMPLES

EXEMPLE 1

Des support plans de dimension $25 \times 15 \times 0,5 \text{ mm}^3$ de polyéthylène fonctionnalisé avec 0,26 % en poids d'anhydride maléique (EXEMPLE 1), ou de polypropylène fonctionnalisé avec 0,05% (EXEMPLE 2) ou 0,08% en poids (EXEMPLE 3) d'anhydride maléique, sont réalisés comme suit :

Le polymère fonctionnalisé est introduit, sous forme de granulés, dans un moule en acier et l'ensemble est inséré dans une presse dont les plateaux sont maintenus à 200°C . Après 10 minutes de séjour, le support obtenu est refroidi, en présence d'une masse appliquée, destinée à limiter toute déformation. Le support est ensuite placé entre deux lames de verre greffées avec du *n*-octadécyl-triéthoxysilane (OTES) (obtenues par immersion de lames de verre pendant 15 minutes dans un mélange acide sulfurique/eau oxygénée à 30° , 70/30, v/v, suivie d'un rinçage à l'eau ultrapure et d'une immersion pendant 15 heures dans une solution d'OTES à 2 % dans le toluène anhydre) et réintroduit dans une étuve thermostatée à 180°C . Une masse est appliquée sur cet assemblage et l'étuve est mise sous vide primaire, afin de limiter les phénomènes d'oxydation. Après 1 heure 30 minutes, le vide est rompu et l'assemblage est refroidi lentement. Le support est alors lavé pendant deux heures avec du chloroforme, puis séché.

A titre de comparaison, des supports réalisés en polyéthylène hyper haute densité (référence : PE-hhd ELTEX de la société SOLVAY)(PE) ou en polypropylène (référence : PP 3120 de la société APPRYL)(PP) sont préparés, selon le même mode opératoire, en remplaçant les lames de verre greffées avec de l'OTES, par des lames de verre simples.

Les angles de contact obtenus au mouillage de la surface des support des EXEMPLES 1 à 3 avec de l'eau ultra pure (θ_a) et au démouillage de la surface (θ_r) ont été mesurés. L'hystérésis $\Delta\theta = \theta_a - \theta_r$ rend compte de la réorganisation de la

surface avec l'eau. Les résultats obtenus avec les **EXEMPLES 1, 2 et 3** sont comparés avec ceux obtenus avec les supports **PE** et **PP**.

Les angles de contact donnés dans le **TABLEAU 1** ci-après sont des angles moyens calculés à partir de l'ensemble des mesures effectuées sur une surface. Ils sont complétés par un écart type rendant compte de l'hétérogénéité de la surface étudiée.

TABLEAU 1

CARTE	$\theta_a, ^\circ$	$\theta_r, ^\circ$	$\Delta\theta, ^\circ$
PE	$103,7 \pm 0,77$	$101,4 \pm 0,81$	2,3
EXEMPLE 1	$75,2 \pm 4,5$	$44,1 \pm 7,2$	24
PP	$104,7 \pm 2,0$	$98,0 \pm 2,5$	6,7
EXEMPLE 2	$98,8 \pm 6,1$	$81,0 \pm 5,8$	17,8
EXEMPLE 3	$84,2 \pm 2,7$	$66,7 \pm 5,5$	17,5

Les angles de contact obtenus pour les polyoléfines non fonctionnalisées correspondent aux valeurs trouvées dans la littérature.

Les angles de contact obtenus pour les **EXEMPLES 1, 2 et 3**, tant au mouillage qu'au démouillage, sont plus faibles que ceux obtenus avec les polyoléfines non fonctionnalisées. Cette diminution assez importante est attribuée à la présence des groupements polaires de type anhydride maléique ou $-\text{COOH}$ présents en surface et ceci, malgré des taux d'incorporation faibles (0,26 % au maximum pour l'**EXEMPLE 1**).

De plus, l'augmentation de $\Delta\theta$ obtenu avec les **EXEMPLES 1, 2 et 3** par rapport aux polyoléfines non fonctionnalisées correspondantes, prouve la réorganisation des groupements de surface des supports sous l'action d'un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques : sous la goutte d'eau, les fonctions d'anhydride maléique sont attirées en surface et s'orientent vers le liquide et certaines de ces fonctions d'anhydride maléique sont hydrolysées pour donner des fonctions acides $-\text{COOH}$.

EXEMPLE 4

Sur le support de l'**EXEMPLE 1**, on fait circuler, à température ambiante, de l'eau pure, puis ce support est plongé, toujours à température ambiante, pendant 15 heures, dans une solution contenant 2 % en poids de diméthyléthoxysilane (DMES) dans du toluène anhydre.

Avant de mesurer les angles de contact, les supports sont rincées au chloroforme pour garantir l'extraction des polycondensats de silane physisorbés à la surface du polymère.

Les angles de contact de l'eau obtenus sont présentés dans le **TABLEAU 2** ci-après.

TABLEAU 2

CARTE	θ_a	θ_r	$\Delta\theta$
PE	$103,7 \pm 0,77$	$101,4 \pm 0,81$	2,3
EXEMPLE 1	$75,2 \pm 4,5$	$44,1 \pm 7,2$	24
EXEMPLE 4	$102,8 \pm 2,6$	$76,4 \pm 4,7$	26,4

Ces résultats montrent que le greffage de DMES permet d'obtenir une surface présentant un caractère hydrophobe proche de celui obtenu avec un support réalisé en polyéthylène non modifié (PE).

EXEMPLE 5

Cinq traitements différents sont effectués, à température ambiante, sur le support de l'**EXEMPLE 1**, dans le but de caractériser l'adsorption et/ou le couplage d'oligonucléotides sur le polymère fonctionnalisé :

EXEMPLE 5 A : EXEMPLE 1 activé par du carbodiimide

EXEMPLE 5B : EXEMPLE 1 traité par immersion dans l'eau pendant 15 heures

EXEMPLE 5C : EXEMPLE 1 traité par immersion dans l'eau pendant 15 heures et activé par du carbodiimide.

EXEMPLE 5D : EXEMPLE 1 traité par immersion dans une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (> 10 mM) pendant 15 heures.

- 5 **EXEMPLE 5E :** EXEMPLE 1 traité par immersion dans une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (> 10 mM) pendant 15 heures et activé par du carbodiimide.

Les EXEMPLES 5A à 5E sont soumis au test ELOSA (de l'anglais "Enzyme-Linked OligoSorbent Assay", on pourra se référer à F. Mallet *et al.*, J. Clin. Microbiol., 1993, 31(6), 1444-1449 et à WO 91/19812), de détection d'acides nucléiques sur support solide. Ce test, reposant sur l'hybridation moléculaire entre oligonucléotides et acides nucléiques cibles, est effectué, dans le cas présent, pour détecter la présence ou non d'une "sonde de capture" sur un support solide. Un acide
10 nucléique cible possédant une séquence complémentaire de celle de l'oligonucléotide (ODN de capture), est mis en contact avec la carte d'analyse. La complémentarité des séquences entraîne une hybridation des deux molécules. Un ODN de détection est ensuite ajouté. Il s'hybride sur une séquence complémentaire de la cible, différente de la première. L'enzyme catalyse ensuite la transformation d'un substrat en un
15 produit détectable, dont la concentration est proportionnelle à la concentration en cible.

L'ODN cible utilisé de SEQ ID n°1 comprend 78 bases :

SEQ ID n°1 : 5'-AAG TAT CCC CAT AAG TTT CAT AGA TAT ATT GTT CTA
AGC TAT GGA GCC ATA TCC TAG GAA AAT GTC TAA CAG CTT CAC-3'

- 25 L'ODN de capture utilisé de SEQ ID n°2 comprend 20 bases et comporte un bras aminé en position 5', comme décrit dans la demande de brevet publiée sous le numéro WO 91/19812 :

SEQ ID n°2 : 5'- TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC -3'

- Ce test comprend quatre étapes : une étape d'immobilisation de l'ODN de
30 capture, une étape d'incubation de la cible sur l'ODN de capture immobilisé, une étape d'incubation de l'ODN de détection sur la cible et une étape d'analyse

colorimétrique, correspondant à la réaction enzymatique. Ce test se déroule de la manière suivante.

Une étape d'immobilisation de l'ODN de capture correspond à la mise en présence de la sonde de capture sur le support polymère. La sonde de capture utilisée
5 est terminée par une fonction amine aliphatique primaire. En cas de couplage avec une fonction anhydride en surface, le couplage est assuré par la réaction directe de cette fonction avec la fonction amine primaire de l'ODN de capture. Pour le cas, où les groupements présents en surface seraient des fonctions -COOH issues de l'hydrolyse des anhydrides, un agent d'activation tel le 1-éthyl-3-(3-
10 diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) est utilisé.

Typiquement, 40 µl d'une solution contenant 0,05 pmole/µl d'ODN de capture, en présence ou non de 0,2 pmole/µl d'EDC en tampon Phosphate 10 mM, pH 6,8 sont placés en contact avec la surface pendant 1 heure. Le support est ensuite lavé par le tampon de lavage (tampon Phosphate 0,05 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05 %, pH 7,2) afin d'éliminer les biomolécules faiblement absorbées. Ce tampon est utilisé
15 dans toutes les étapes de lavage.

L'incubation de la cible est réalisée en déposant, pendant 1 heure, 40 µl d'une solution contenant 10¹² copies/ml de tampon d'hybridation (phosphate 0,06 M, NaCl 0,9 M, ADN de sperme de saumon 50 mg/ml, lait en poudre 3 % en poids, Triton
20 0,05 %, pH 7,4). En fin d'incubation, le support est rincé par le tampon de lavage.

L'ODN de détection de SEQ ID n°3 est un conjugué constitué d'un fragment d'acide nucléique de 23 bases complémentaire de la cible et greffé en position 5' sur une enzyme, l'"Horse Radish Peroxydase" ou HRP, comme décrit dans la demande de brevet publiée sous le numéro WO 91/19812 :

25 SEQ ID n°3 : 5'-GAA GCT GTT AGA CAT TTT CCT AG -3'

L'hybridation de ce conjugué sur la cible immobilisée est réalisée en laissant incubé, pendant 1 heure, 40 µl d'une solution d'ODN de détection à 0,05 pmole/ml de tampon d'hybridation. En fin d'incubation, le support est rincé par le tampon de lavage.

30 L'analyse colorimétrique est réalisée de la manière suivante. Les échantillons sont mis en présence du substrat colorimétrique de l'HRP, l'ortho-phénylène diamine ou OPD. Initialement incolore, celui-ci est transformé par l'HRP en un produit

coloré, l'orthonitroaniline. Après 10 minutes de révélation, la réaction enzymatique est stoppée par ajout d'une solution d'acide sulfurique 1N dans le milieu. La densité optique (DO) de la coloration, proportionnelle à la quantité d'enzyme, et donc à la quantité de cibles hybridées, est mesurée à 492 nanomètres.

5 Ce test permet donc de caractériser l'adsorption et/ou le couplage d'oligonucléotides sur le polymère étudié. Il permet également de déterminer la nature des fonctions chimiques présentes à la surface des échantillons. La présence de la sonde de détection reflète en effet, la présence préalable de la sonde de capture sur la surface (qu'elle soit adsorbée ou couplée), donc la présence d'un site
10 réactionnel.

Les résultats obtenus après test ELOSA sur l'**EXEMPLE 1** et les **EXEMPLES 5A à 5E** par détection colorimétrique sont présentés à la **fig. 4**. Ces résultats prouvent que des fonctions -COOH, présentes à la surface des supports des **EXEMPLES 5C et 5E**, sont couplées avec des biomolécules. Aussi ces résultats
15 démontrent que le traitement de la surface du polymère fonctionnalisé à l'anhydride maléique avec de l'eau ou une solution d'hydroxyde de potassium attire les fonctions d'anhydride maléique du volume vers la surface puis les hydrolyse en fonctions -COOH.

20

REVENDEICATIONS

1 - Carte d'analyse dont le support est fabriqué à partir d'un polymère, caractérisée en ce que ce polymère :

- a une température de transition vitreuse inférieure à 60°C, et
- 5 – est hydrophobe en l'absence de fonctionnalisation, et
- est fonctionnalisé dans sa masse par des fonctions hydrophiles réactives, ou génératrices de fonctions hydrophiles réactives.

2 - Carte d'analyse selon la revendication 1 caractérisée en ce que le polymère est fonctionnalisé dans sa masse par des fonctions hydrophiles réactives, ou génératrices
10 de fonctions hydrophiles réactives choisies parmi les fonctions anhydride, époxyde, acide carboxylique, hydroxyle ou amine primaire.

3 - Carte d'analyse selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le polymère a une température de transition vitreuse inférieure à 37°C, préférentiellement inférieure à 20°C.

15 4 - Carte d'analyse selon la revendication 3, caractérisée en ce que le polymère utilisé est une polyoléfine fonctionnalisée.

5 - Carte d'analyse selon la revendication 4, caractérisée en ce que le polymère utilisé est un polyéthylène fonctionnalisé.

20 6 - Carte d'analyse selon la revendication 4, caractérisée en ce que le polymère utilisé est un polypropylène fonctionnalisé.

7 - Carte d'analyse selon l'une quelconque des revendication 1 à 6, caractérisée en ce que le polymère est fonctionnalisé par de l'anhydride maléique.

8 - Carte d'analyse selon la revendication 7, caractérisée en ce que le polymère contient de jusqu'à 2%, de préférence jusqu'à 0,3% en poids d'anhydride maléique.

25 9 - Procédé pour modifier, au moins en partie, la surface du polymère constitutif du support d'une carte d'analyse selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement de ladite surface, réalisée à une température supérieure à la température de transition vitreuse du polymère, avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions
30 hydrophiles réactives, cette étape de traitement entraînant la migration en surface des fonctions hydrophiles réactives présentes dans la masse du polymère et éventuellement leur hydrolyse en d'autres fonctions hydrophiles réactives.

10 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives est un liquide contenant au moins 50 % en poids d'eau.

11 - Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que l'étape de traitement est suivie par une étape de greffage chimique, sur les fonctions hydrophiles réactives présentes en surface, de ligands biologiques.

12 - Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les ligands biologiques sont choisis parmi les polynucléotides, les antigènes, les anticorps, les polypeptides, les protéines, et les haptènes.

13 - Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que l'étape de traitement est suivie par une étape de greffage chimique, sur les fonctions hydrophiles présentes en surface, de groupements hydrophobes.

14 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que les groupements hydrophobes sont choisis parmi les thiolsilanes et les alkylsilanes.

15 - Procédé pour modifier localement la surface du polymère constitutif du support d'une carte d'analyse selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que :

(1) une étape de traitement de ladite surface, réalisée à une température supérieure à la température de transition vitreuse du polymère, avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, cette étape de traitement entraînant la migration en surface des fonctions hydrophiles réactives présentes dans la masse du polymère et éventuellement, leur hydrolyse en d'autres fonctions hydrophiles réactives, suivie,

(2a) d'une étape de greffage chimique, sur les fonctions hydrophiles réactives présentes en surface, de groupements hydrophobes,
- des zones hydrophiles en surface du polymère en effectuant sur les zones à modifier :

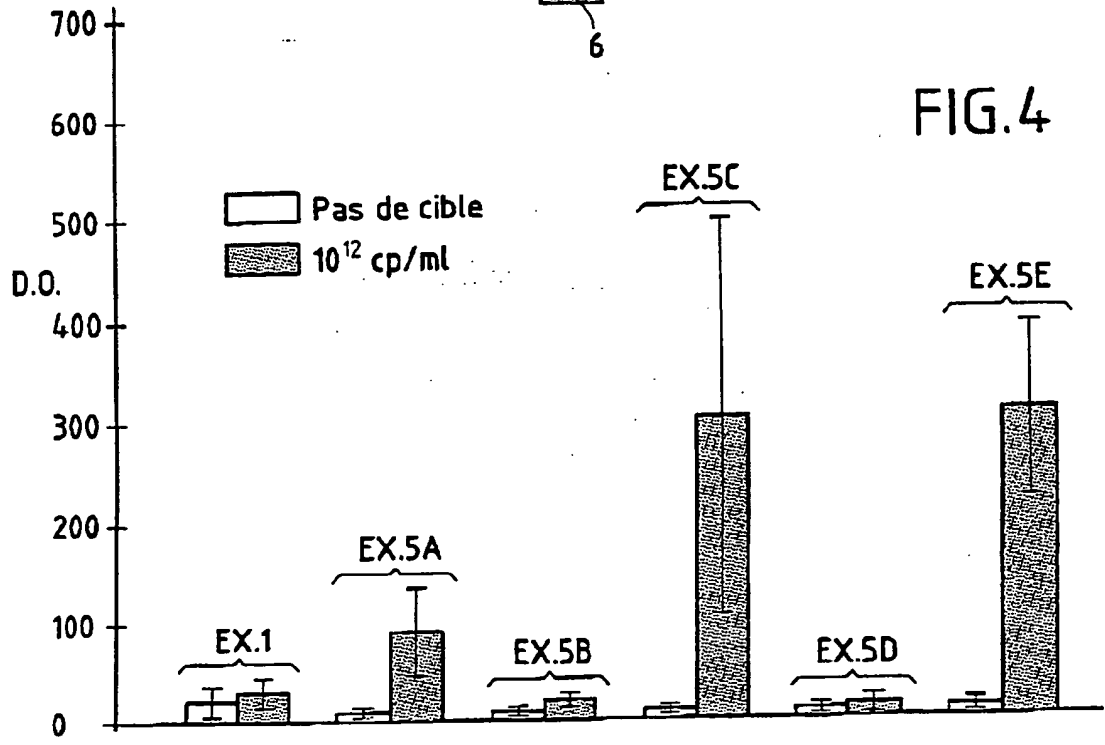
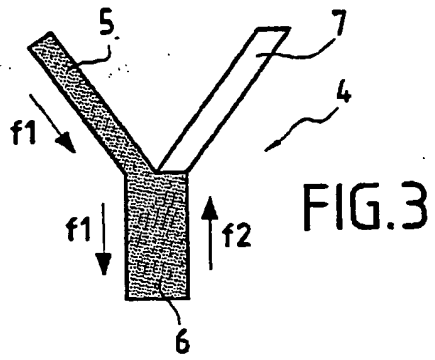
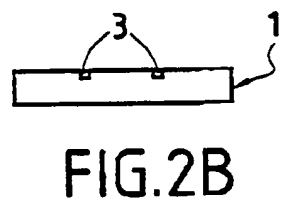
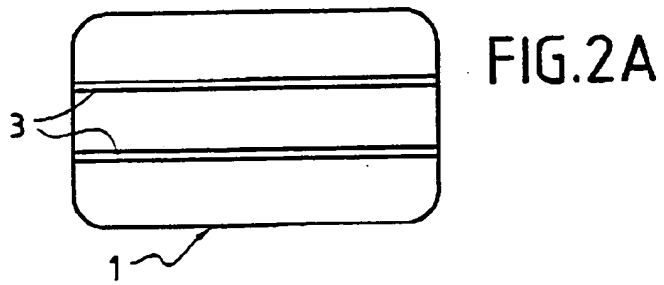
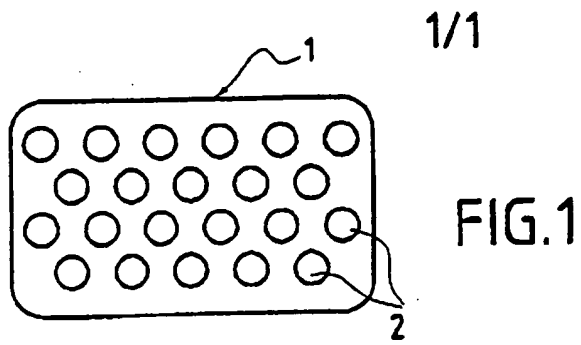
(1) une étape de traitement de ladite surface, réalisée à une température supérieure à la température de transition vitreuse du polymère, avec un milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives, cette étape de traitement entraînant la

migration en surface des fonctions hydrophiles réactives présentes dans la masse du polymère et éventuellement, leur hydrolyse en d'autres fonctions hydrophiles réactives, suivie éventuellement,

5 (2b) d'une étape de greffage chimique, sur les fonctions hydrophiles réactives présentes en surface, de ligands biologiques.

16 - Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'à l'étape de traitement (1), le milieu susceptible de créer des interactions acido-basiques avec les fonctions hydrophiles réactives est un liquide contenant au moins 50 % en poids d'eau.

10 17 - Carte d'analyse selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que son support a une surface modifiée, au moins en partie, selon le procédé de l'une quelconque des revendications 9 à 16.



LISTAGE DES SEQUENCES**INFORMATIONS GENERALES :****(i) DEPOSANT :**

(A) NOM : BIO MERIEUX

(B) NOM : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

(C. N. R. S.)

(ii) TITRE DE L'INVENTION : Cartes d'analyse

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 3

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR :

(A) TYPE DE SUPPORT : Floppy disk

(B) ORDINATEUR : IBM PC compatible

(C) SYSTEME D'EXPLOITATION : Windows 95

(D) LOGICIEL : Microsoft Office Word pour Windows 95

INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 1 :**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :****(A) LONGUEUR :** 78 nucléotides**(B) TYPE :** acide nucléique**(ii) TYPE DE MOLECULE :** acide nucléique**(iii) HYPOTHETIQUE :** non**(ix) CARACTERISTIQUES :****(A) NOM/CLE :** cible synthétique**(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 1**

AAGTATCCCC	ATAAGTTTCA	TAGATATATT	GTTCTAAGCT
10	20	30	40
ATGGAGCCAT	ATCCTAGGAA	AATGTCTAAC	AGCTTCAC
50	60	70	

INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 2 :**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :****(A) LONGUEUR :** 20 nucléotides**(B) TYPE :** acide nucléique**(ii) TYPE DE MOLECULE :** acide nucléique**(iii) HYPOTHETIQUE :** non**(ix) CARACTERISTIQUES :****(A) NOM/CLE :** sonde de capture**(D) AUTRES INFORMATIONS :** oligonucléotide couplé par synthèse chimique à un bras portant une fonction amine en position 5'.**(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 2**

TATGAAACTT	ATGGGGATAC
10	20

INFORMATION SUR LA SEQ ID NO 3 :**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :****(A) LONGUEUR : 23 nucléotides****(B) TYPE : acide nucléique****(ii) TYPE DE MOLECULE : acide nucléique****(iii) HYPOTHETIQUE : non****(ix) CARACTERISTIQUES :****(A) NOM/CLE : sonde de détection****(D) AUTRES INFORMATIONS : oligonucléotide couplé par synthèse chimique
à l'"Horse Radish Peroxydase" en position 5'****(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO 3****GAAGCTGTTA GACATTTTCC TAG****10****20**



2826454

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 608826
FR 0108466

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	EP 0 443 231 A (ENVIRONMENTAL DIAGNOSTICS, INC.) 28 août 1991 (1991-08-28) * colonne 4, ligne 25 - colonne 5, ligne 17; revendications 1-10 *	1-17	G01N33/545 B01L3/00
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 200031 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A89, AN 2000-353210 XP002192053 & JP 2000 046797 A (ZH KAWAMURA RIKAGAKU KENKYUSHO), 18 février 2000 (2000-02-18) * abrégé *	1-17	
Y	EP 0 591 807 A (BAYER AG) 13 avril 1994 (1994-04-13) * revendications 1-8 *	1-17	
Y	WO 01 32730 A (THE UNIVERSITY OF AKRON) 10 mai 2001 (2001-05-10) * page 33, ligne 13 - ligne 25; revendications 1-16 *	1-17	
A	DE 199 08 525 A (INSTITUT FÜR CHEMO- UND BIOSENSORIK MÜNSTER E.V.) 31 août 2000 (2000-08-31) * le document en entier *	1	
A	WO 95 34813 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 21 décembre 1995 (1995-12-21) * revendications 1-22 *	1	
A	US 4 352 884 A (T. NAKASHIMA) 5 octobre 1982 (1982-10-05) * revendications 1-14 *	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C08F G01N C12M C08J B01L
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
5 mars 2002		Permentier, W	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

2826454

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0108466 FA 608826**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date d'05-03-2002
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 443231 A	28-08-1991	EP 0443231 A1	28-08-1991
		CA 2010569 A1	21-08-1991
		DE 69023476 D1	14-12-1995
		DE 69023476 T2	21-03-1996
		ES 2081924 T3	16-03-1996
JP 2000046797 A	18-02-2000	AUCUN	
EP 591807 A	13-04-1994	DE 4322884 A1	14-04-1994
		EP 0591807 A2	13-04-1994
		JP 6199930 A	19-07-1994
		US 5453461 A	26-09-1995
WO 0132730 A	10-05-2001	AU 7878600 A	14-05-2001
		WO 0132730 A1	10-05-2001
DE 19908525 A	31-08-2000	DE 19908525 A1	31-08-2000
		WO 0052064 A1	08-09-2000
WO 9534813 A	21-12-1995	EP 0765477 A1	02-04-1997
		JP 10502102 T	24-02-1998
		WO 9534813 A1	21-12-1995
US 4352884 A	05-10-1982	JP 1391956 C	23-07-1987
		JP 56115727 A	11-09-1981
		JP 61059175 B	15-12-1986
		DE 3105768 A1	14-01-1982
		FR 2476125 A1	21-08-1981
		IT 1169212 B	27-05-1987

EPO FORM P0465